# UNTERSUCHUNGEN ZUR TYPISIERUNG VON HERPES-SIMPLEX-VIRUS-ANTIKÖRPERN IN PATIENTEN-SEREN MIT HILFE DES MIKRO-NEUTRALISATIONSTESTES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
ARNULF LEHMKÖSTER
aus Siegen

Bonn 1976

# UNTERSUCHUNGEN ZUR TYPISIERUNG VON HERPES-SIMPLEX-VIRUS-ANTIKÖRPERN IN PATIENTEN-SEREN MIT HILFE DES MIKRO-NEUTRALISATIONSTESTES

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
ARNULF LEHMKÖSTER
aus Siegen

Bonn 1976

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K.E. SCHNEWEIS
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Botzenhart

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn

Direktor: Professor Dr. H. Brandis

Druck: R. Schwarzbold, 5305 Witterschlick b. Bonn

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis


1. Einleitung..... 5
2. Material..... 9
2.1. Seren..... 9
2.2. Virusstämme..... 9
2.3. Zellkulturen..... 9
2.4. Zellkulturmedien..... 10
2.5. Geräte..... 10
3. Methodik..... 11
3.1. Anzüchtung von Human Embryo Fibroblasts (HEF)..... 11
3.2. Herstellung der Viruspräparationen für Mikro-Neutralisationstest (MNT) und Absorption..... 11
3.3. Titerbestimmung der Viruspräparationen und Definition der Gebrauchsverdünnung..... 11
3.4. MNT und Bestimmung des Neutralisations-Potentials ($p_N$-Wert)..... 13
3.5. Absorption der Seren..... 16
4. Ergebnisse..... 17
4.1. Untersuchung von Kaninchen-Hyperimmunseren..... 17
4.2. Untersuchung von Kinderseren..... 19
4.3. Untersuchung der Seren von Collumcarcinom-Patientinnen.. 24
4.4. Die methodische Fehlerbreite bei mehrfacher Untersuchung des gleichen Serums..... 28
4.5. Einfluß von inaktivem Virus auf den MNT..... 32
5. Diskussion..... 34
5.1. Der MNT sowie die Bildung der $p_N$-Differenzen im Vergleich zu anderen Methoden zur Bestimmung des Herpes simplex Virus-Antikörper-Typs..... 34
5.2. Theoretische und experimentelle Grundlagen zur Bestimmung des Herpes simplex Virus-Antikörper-Typs..... 36
5.3. Abhängigkeit des Neutralisationstests vom Zellsystem, vom Virusstamm und von der Viruspräparation, insbesondere vom Anteil an inaktivem Virus in der Viruspräparation..... 40
5.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse von vier Versuchsreihen..... 43

6. Zusammenfassung..... 45
7. Literaturverzeichnis..... 47

## 1. Einleitung

Seit der Differenzierung des Herpes simplex Virus (HSV) in die Typen 1 und 2 (Schneweis und Brandis, 1961; Schneweis, 1962) sind zahlreiche Methoden zur Unterscheidung der beiden Typen angegeben worden (vergl. Schulte-Holthausen und Schneweis, 1975). Neben mehreren serologischen Verfahren und der DNS-DNS-Hybridisierung sind dies vor allem Methoden, die auf verschiedenen biologischen Eigenschaften der Herpestypen beruhen, und von denen einige, wie der unterschiedliche cytopathische Effekt in Zellkulturen, das Verhalten auf der Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnereies, sowie die Stabilität gegenüber Wärme- und Hitzeeinwirkung, schon länger bekannt sind (Schneweis, 1962).

Als gesichert erscheint heute, daß HSV Typ 1 Erreger der Herpes-Virus-Stomatitis, des Herpes labialis, der Keratoconjunctivitis herpetica, des Ekzema herpeticum sowie der Meningoencephalitis herpetica ist. Auf der anderen Seite steht der venerisch übertragene Herpes genitalis, der meist vom Typ 2 hervorgerufen wird, ebenso wie der oft bösartige Herpes neonatorum, an dem Kinder von Herpes genitalis-infizierten Müttern erkranken können, wenn sie sich auf dem Geburtsweg infizieren (Dowdle u. Mitarb., 1967; Schneweis, 1967).

In den letzten Jahren interessierte besonders die Frage, ob HSV Typ 2, der Erreger des Herpes genitalis, in ursächlichen Zusammenhang mit dem Carcinoma colli uteri gebracht werden könne, ein Zusammenhang, der erstmalig 1968 von einer Gruppe von Wissenschaftlern - Gynäkologie, Virologe, Zytopathologe - in Atlanta, Georgia, geäußert wurde (Josey, W.E.; Nahmias, A.J.; Naib, Z.M., 1968; s.a. Rawls u. Mitarb., 1968).

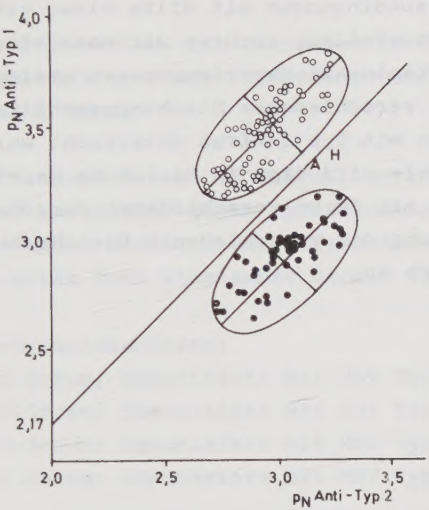
Einer unter zahlreichen Ansätzen, diese Frage zu erhellen, besteht in seroepidemiologischen Untersuchungen. Zu seroepidemiologischen Studien aber braucht man eine Methode, die es erlaubt, die Antikörper gegen die beiden HSV-Typen zu bestimmen. Erschwerend wirkt sich dabei aus, daß 80 - 95 % der erwachsenen Bevölkerung mit HSV Typ 1 durchseucht sind und Antikörper gegen diesen Typ besitzen (Nahmias und Mitarb., 1970; Petersen und Mitarb., 1972), die ihrer-

seits den Typ 2 aufgrund gemeinsamer Antigene der beiden Typen ebenfalls neutralisieren. Der Mikro-Neutralisationstest (MNT) gilt z.Z. als die beste Methode zur Unterscheidung der beiden Antikörpertypen (Rawls und Mitarb., 1970).

Im MNT werden die Neutralisationspotenzen ($p_N$-Werte) des Serums gegen einen HSV-1-Prototyp ($p_{N1}$-Wert) sowie einen HSV-2-Prototyp ($p_{N2}$-Wert) ermittelt. Die $p_N$-Werte werden aus den Antikörpertitern nach Fazekas de St.Groth (1961) errechnet, wobei neben dem jeweiligen Serumtiter sowie Korrekturgrößen für die Serumverdünnung auch der für den Versuch aktuelle Virustiter in die Berechnung eingeht. Zur Typisierung der Antikörper benutzt man die $p_N$-Differenzen (Pauls und Dowdle, 1967) oder die Titer-Quotienten (Rawls und Mitarb., 1970).

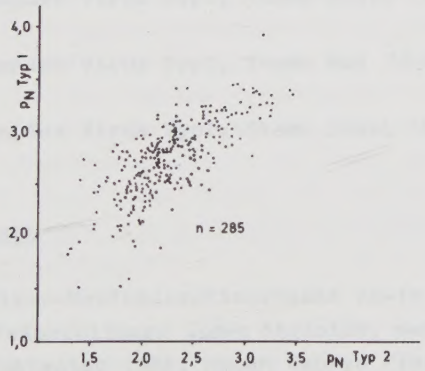
Während sich bei der Typisierung von HSV-Stämmen im MNT mit einem geeigneten Antiserumpaar Typ 1- und Typ 2-Stämme als zwei deutlich getrennte Gruppen abgrenzen lassen (Abb.1), gehen die Ergebnisse bei der entsprechenden Typisierung von Antikörpern kontinuierlich ineinander über (Abb.2) (Schneweis, 1974; Haag und Schneweis, 1975).

Abb.1




Typisierung von Herpes simplex Virus - Stämmen im Mikro - Neutralisationstest
o Typ 1; • Typ 2;

Abb.2




Typisierung von Herpes simplex Virus - Antikörpern in Patienten Seren

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wo im MNT die Grenze zwischen einem Typ 1-Serum und einem Typ 2-Serum zu ziehen ist. Da es sehr umständlich und zeitraubend ist, die jeweiligen Versuchsbedingungen mit Hilfe einer größeren Zahl von Patientenseren einzustellen, suchten wir nach einem Modell. Dazu erschienen uns Kaninchen-Hyperimmunseren geeignet, die für sich allein und in verschiedenen Mischungsverhältnissen vor und nach der Absorption mit Typ 1-Virus untersucht wurden. Die derart ermittelte Grenzlinie wird dann in Beziehung gesetzt zu den Ergebnissen der MTNs mit Seren verschiedener Personengruppen. Eine kritische Betrachtung der verschiedenen Unsicherheitsfaktoren im MNT schließt sich an.

# 2. Material

## 2.1. Seren

2.1.1. Seren von Patientinnen mit Carcinoma in situ oder invasivem Carcinom des Collum uteri (CCa-Seren) aus der Universitäts-Frauenklinik, Bonn.

2.1.2. Seren von Kindern bis zu 13 Jahren, deren Seren zur Untersuchung auf Antikörper gegen verschiedene virusbedingte Infektionen an das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Bonn eingesandt worden waren.

2.1.3. Kaninchen-Hyperimmunseren:
Anti-HSV-1-Serum; immunisiert mit HSV Typ1, Stamm Thea
Anti-HSV-2-Serum; immunisiert mit HSV Typ2, Stamm Haase
Anti-HSV-1-Serum; immunisiert mit HSV Typ1, Stamm Rup
Anti-HSV-2-Serum; immunisiert mit HSV Typ2, Stamm Schat

## 2.2. Virus-Stämme

2.2.1. Herpes simplex Virus (HSV) Typ1, Stamm Thea (Schneweis, 1962)

2.2.2. Herpes simplex Virus Typ2, Stamm Haase (Schneweis,1962)

2.2.3. Herpes simplex Virus Typ1, Stamm Rup (Schneweis, 1962)

2.2.4. Herpes simplex Virus Typ2, Stamm Schat (Schneweis, 1962)

## 2.3. Zellkulturen

Für die Mikro-Neutralisationstests sowie für die Gewinnung von Virus-Präparationen wurden diploide, menschliche embryonale Fibroblasten (HEF, Human Embryo Fibroblasts) verwendet.

## 2.4. Zellkulturmedien

### 2.4.1. Wachstumsmedium ("Eagle 15")

Eagle Grundlösung in Earl'scher Salzlösung mit Zusatz von 10 % Kälberserum, 5 % fetalem Kälberserum, 2 % einer 2,8 %igen Lösung von Natriumbikarbonat, 0,05% Hühnerembryonalextrakt (fünf 9 Tage alte Embryonen in 100 ml PBS (Phosphate Buffered Saline)), 100 E Penicillin G und 100 µg Streptomycin pro ml.

### 2.4.2. Erhaltungsmedium ("Eagle 10")

Wie Wachstumsmedium, jedoch ohne Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum.

## 2.5. Geräte

### 2.5.1. Geräte für die Ultrazentrifugation

Benutzt wurde das System der Fa. Beckman Instruments, Inc. Spinco Division, Paolo Alto, California.
Cellulose Nitrat Ultracentrifuge Tubes Nr.305528 (0,8 ml), Rotor SW 50 L, Adapter für Rotor und Ultracentrifuge Tubes, Ultracentrifuge Spinco L2 65B

### 2.5.2. Geräte für Mikro-Neutralisationstest

Mikrotiterplatten, Micro Test II Culture Plates der Fa. Falcon Plastics, Los Angeles
Mikrodropper (0,05 ml und 0,025 ml) der Fa. Cooke Engineering Co., Alexandria, Virginia
Klebefolien Nr. 3044 der Fa. Falcon Plastics, s.o.
$CO_2$-Brutschrank der Fa. Ehret, Emmendingen-Kollmarsreute
umgekehrtes Mikroskop der Fa. Leitz, Wetzlar, Vergrößerung 10 x 4 und 10 x 10.

# 3. Methodik

## 3.1. Anzüchtung von HEF

Von menschlichen Embryonen wurden die Lungen entnommen, fein zerschnitten, in PBS gewaschen und in 0,25 %igem Trypsin aufgeschlossen. Die gewonnenen Zellen wurden, in Wachstumsmedium aufgeschwemmt, in Kulturflaschen gegeben. Wenn ein geschlossener Zellrasen gewachsen war, wurde das Nährmedium abgegossen und der Zellrasen mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden dann in der doppelten Menge von frischem Eagle 15 resuspendiert und so in Passagen bis zur Erschöpfung der Vermehrungsfähigkeit gehalten.

## 3.2. Herstellung der Viruspräparationen für MNT und Absorption

HEF in Roux-Flaschen wurden mit 0,1 ml hochtitrigem Virus in 10 ml "Eagle 10" beimpft. Die Adsorption erfolgte für 3 Stunden bei $33^{\circ}$ C unter ständiger Bewegung auf einem "Rocker" (Fa. Bellco, Vineland, N.J.), danach wurde mit "Eagle 10" auf 50 ml aufgefüllt. Nach eingetretenem totalen cytopathischen Effekt (CPE) nach etwa 2 bis 3 Tagen wurden die Zellen mit Glasperlen von der Flaschenwand abgelöst und 15 min bei 1000 upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem Volumen von 3 ml 3 x 15 sec durch Ultraschall (Ultraschallgerät 100 W der Fa. MSE, London) aufgeschlossen. Die Viruspräparation für den MNT wurden in einem Teil "Eagle 10" plus ein Teil Magermilch, die für die Absorption in PBS hergestellt. Alle Viruspräparationen wurden bei $-70^{\circ}$ C aufbewahrt.

## 3.3. Titerbestimmung der Viruspräparation und Definition der Gebrauchsverdünnung

### 3.3.1. Titerbestimmung der Viruspräparationen

Von den Viruspräparationen HSV Typ1, Stamm Thea und HSV Typ2, Stamm Haase wurden Verdünnungsreihen in log 10 von $10^{-2}$ bis $10^{-8}$ mit "Eagle 15" hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen wurden 0,025 ml in jeweils 6 Löcher der

Mikrotiterplatte getropft, dazu kamen pro Loch je 0,025 ml "Eagle 15" sowie 0,05 ml HEF-Zellsuspension in "Eagle 15" mit ca. $10^6$ Zellen pro ml. Die Platten wurden mit Klebefolie unter sorgfältigem Andrücken auf den Lochrändern zugeklebt. Nach zweitägiger Inkubation im $CO_2$-Inkubator bei 36° C wurde jedes einzelne Loch auf einen eingetretenen CPE im umgekehrten Mikroskop betrachtet. Die Berechnung der Titer erfolgte in HEF-$ID_{50}$ (HEF-$ID_{50}$ = die Virusdosis, die einen CPE bei 50 % der 6 Zellkulturen der Mikrotiterplatte, die pro Verdünnungsstufe angesetzt waren, hervorrief) nach der Methode von Reed und Muench (1938).

3.3.2. Definition der Gebrauchsverdünnung

Als Gebrauchsverdünnung für den MNT wurde die Viruskonzentration definiert, die den 100fachen $ID_{50}$-Titer pro 0,025 ml besaß, also $ID_{50}$ x 100.

3.3.3. Beispiel einer Titerbestimmung

| | HSV, Stamm Thea | HSV, Stamm Haase |
|---|---|---|
| $10^{-2}$ | + + + + + + | + + + + + + |
| $10^{-3}$ | + + + + + + | + + + + + + |
| $10^{-4}$ | + + + + + + | + + + + + + |
| $10^{-5}$ | + + + + + + | + + + + + - + |
| $10^{-6}$ | + + + + + + | - - - - - - - |
| $10^{-7}$ | + + + + + + | - - - - - - - |
| $10^{-8}$ | - - - + + - | - - - - - - - |

+ = CPE eingetreten

- = kein CPE eingetreten

Berechnung des Virustiters:
HSV, Stamm Thea:

| | a<br>CPE | b<br>kein CPE | a<br>summiert | b | CPE in %<br>der Kulturen |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-7}$ | 6 ↑ | 0 ↓ | 8 | 0 | 100 |
| $10^{-8}$ | 2 | 4 | 2 | 4 | 33,3 |
| $10^{-9}$ | 0 | 6 | 0 | 10 | 0 |

$\frac{100-50}{100-33,3} = 0,75$ Virustiter = $10^{7,0+0,75} = 10^{7,75}$

HSV, Stamm Haase: Virustiter = $10^{5,40}$
Nach o.a. Definition beträgt die Gebrauchsverdünnung im MNT für HSV Stamm Thea $10^{-5,75}$, für HSV Stamm Haase $10^{-3,40}$.

## 3.4. Mikro-Neutralisationstest und $p_N$-Wert-Bestimmung

### 3.4.1. Durchführung des Mikro-Neutralisationstests

Von den zu untersuchenden Seren, die zuvor zur Ausschaltung von Komplement eine Stunde bei 56° C im Wasserbad gehalten worden waren, wurden Verdünnungsreihen in $\log_2$-Stufen mit "Eagle 15" hergestellt. Von jeder Serumverdünnungsstufe wurden in 12 Löcher, das ist eine waagerechte Reihe der MNT-Platte, jeweils 0,025 ml getropft. Die ersten 6 Löcher jeder waagerechten Reihe erhielten nun je 0,025 ml der Virusgebrauchsverdünnung Typ 1, die Löcher 7 bis 12 entsprechend Virusgebrauchsverdünnung Typ 2. Die lose abgedeckte Platte wurde eine Stunde im $CO_2$-Inkubator bei 36° C inkubiert, um das Virus durch die Serum-Antikörper neutralisieren zu lassen. Danach folgte die Zugabe von 0,05 ml Zellsuspension pro Loch und weitere Behandlung wie unter 3.3.1. Mit jeden Test wurde eine Kontrolltitration der Virusgebrauchsverdünnung (sog. Rücktitration) mitgeführt: $10^0$, $10^{-1}$, $10^{-2}$ und $10^{-3}$, je 6 Löcher, wobei 0,025 ml jeder Verdünnungsstufe zu 0,025 ml "Eagle 15" gegeben wurden. Der Zellzusatz war derselbe wie beim MNT.

3.4.2. Beispiel eines Mikro-Neutralisationstests: Serum CCa 68 vor Absorption

| | | HSV Typ1 | | | | | | HSV Typ2 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Serum- | 1:20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| Verdünnungs- | 1:40 | + | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - | |
| Reihe | 1:80 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | |
| | 1:160 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | 1:360 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| Kontrolle | $10^0$ | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | $10^{-2}$ |
| HSV Typ 1 | $10^{-1}$ | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | $10^{-3}$ |
| Kontrolle | $10^0$ | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | $10^{-2}$ |
| HSV Typ 2 | $10^1$ | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | $10^{-3}$ |

\+ = CPE eingetreten

\- = CPE nicht eingetreten

3.4.3. Berechnung

3.4.3.1. Virustiter (Reed und Muench, 1932)

HSV 1

| Virus-verdünnung | a CPE | b kein CPE | a summiert | b | CPE in % der Kulturen |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-1}$ | 6 ↑ | 0 ↓ | 8 | 0 | 100 |
| $10^{-2}$ | 2 ↑ | 4 ↓ | 2 | 4 | 33,3 |
| $10^{-3}$ | 0 ↑ | 6 ↓ | 0 | 10 | 0 |

$$\frac{100-50}{100-33,3} = 0,75$$

Virustiter = $10^{1,0+0,75}$

= $10^{1,75}$

HSV 2

Virustiter = $10^{2,25}$

3.4.3.2. Serumtiter (Reed und Muench, 1932)

gegen HSV 1

| Serum-verdünnung | a CPE | b kein CPE | a summiert | b | CPE in % der Kulturen |
|---|---|---|---|---|---|
| 1:20 | 0 | 6 | 0 | 11 | 0 |
| 1:40 | 2 | 4 | 2 | 5 | 28,6 |
| 1:80 | 5 | 1 | 7 | 1 | 87,5 |

$\frac{50-28,6}{87,5-28,6} = 0,36$

wegen $\log_2$-Stufen: $0,36 \times 0,3 = 0,11$

$10^{1,6+0,11} = 10^{1,71}$

gegen HSV 2

| Serum-verdünnung | a CPE | b kein CPE | a summiert | b | CPE in % der Kulturen |
|---|---|---|---|---|---|
| 1:20 | 0 | 6 | 0 | 7 | 0 |
| 1:40 | 5 | 1 | 5 | 1 | 83,3 |
| 1:80 | 6 | 0 | 11 | 0 | 100 |

$\frac{50-0}{83-0} \times 0,3 = 0,18$

$10^{1,3+0,18} = 10^{1,48}$

3.4.3.3. Berechnung der $p_N$-Werte nach Pauls und Dowdle, 1967, Fazekas de St. Growth, 1961

$p_N = \log (c-0,16) + t + 0,30$

c = Virustiter im MNT

-0,16 für Umwandlung von $ID_{50}$ zu 1 Viruseinheit

t = Serumtiter im MNT

0,30 für Verdünnung des Serums in der Virussuspension

Im Beispiel:

$p_N$ (Anti-Typ 1) = 2,154

$p_N$ (Anti-Typ 2) = 1,942

3.4.3.4. $p_N$-Differenz ($\Delta p_N$)

Zur Typisierung der Antikörper benutzen wir die $p_N$-Differenzen. $\Delta p_N$ war definiert als: $\Delta p_N = p_{N1} - p_{N2}$

## 3.5. Absorption der Seren

HSV Typ1, Stamm Thea, wurde in Roux-Flaschen auf HEF angezüchtet, die virushaltigen Zellen wurden durch Ultraschall (2 x 15 sec.) in PBS aufgeschlossen, anschließend zur Entfernung grober Zelltrümmer bei 3500 upm zentrifugiert. Mehrere auf diese Art gewonnene Präparationen wurden jeweils gepoolt und zur Entfernung von feinerem Zelldetritus 40 min. bei 5000 upm zentrifugiert. Nach Aufteilung in Einzelportionen von 1,8 ml wurde das Virus bei -70° C aufbewahrt, nachdem der Virustiter bestimmt war. Er betrug für die drei verwendeten gepoolten Präparationen $10^{7,50}$, $10^{7,50}$ und $10^{7,75}$.

Zur Absorption (Sim und Watson, 1973) wurden 0,3 ml des zu untersuchenden Serums, 0,3 ml HSV-1 und 0,2 ml "Eagle 15" als Verdünnungsmedium zusammengebracht. Diese Mischung wurde bei + 4° C über Nacht inkubiert, sodann 180 min. bei 35.000 upm zentrifugiert. Ca. 0,7 ml Überstand wurden zur Inaktivierung des Rest-Virus eine Stunde bei 56° C ins Wasserbad gegeben. Es folgte erneut der MNT, beginnend mit einer Serumverdünnung von 1:4. Die Kaninchen-Hyperimmunseren wurden so gemischt, daß die Ausgangsverdünnung für den MNT nach Absorption 1:8 betrug.

# 4. Ergebnisse

## 4.1. Untersuchung von Kaninchen-Hyperimmunseren

Die Versuche mit Kaninchen-Hyperimmunseren dienten dem Zweck, sich eines relativ einfachen Modellverfahrens zur Standardisierung der $\Delta p_N$-Grenze zu bedienen, um damit die umständliche und zeitraubende Einstellung der jeweiligen Versuchsbedingungen mit Hilfe einer größeren Zahl von Patientenseren zu umgehen.

Durch die Herstellung verschiedener Mischungsverhältnisse von Anti HSV-1 mit Anti HSV-2 und durch die Absorption dieser Serumgemische mit HSV-1 sollte die Grenze festgestellt werden, von der an HSV-2-Antikörper in der Serummischung durch eine stärkere Neutralisation von HSV-2 als von HSV-1 ($\Delta p_N < 0$) angezeigt werden. Diese Grenze sollte dann auf den entsprechenden Wert der nicht absorbierten Serummischungen übertragen werden.

Zwei Paare von Kaninchen-Hyperimmunseren wurden getestet: Ein Anti-Thea-Serum (Anti-Typ 1) und ein Anti-Haase-Serum (Anti-Typ 2) sowie ein Anti-Rup- (Anti-Typ 1) und ein Anti-Schat-Serum (Anti-Typ 2). Sie wurden jeweils in den Mischungen: Anti-Typ 1-Serum 100 %, Anti-Typ1-Serum zu Anti-Typ2-Serum wie 80:20, Anti-Typ1-Serum zu Anti-Typ2-Serum wie 50:50, Anti-Typ1-Serum zu Anti-Typ2-Serum wie 20:80 und Anti-Typ2-Serum 100 % sowohl vor als auch nach der Absorption mit HSV-1 im MNT getestet.

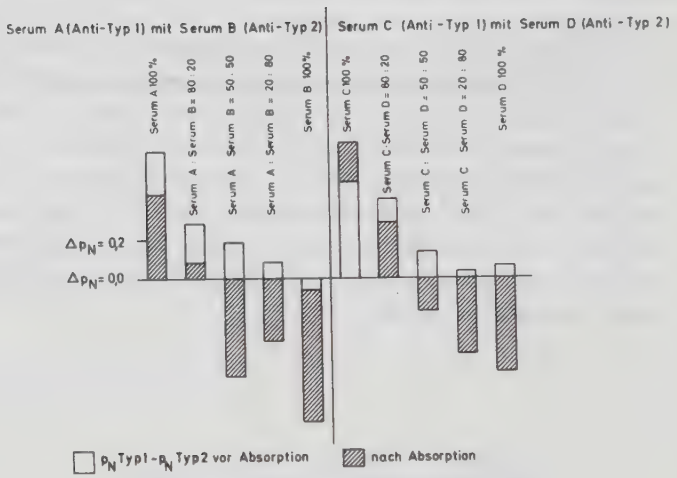
Die Ergebnisse zeigen Tabelle 1 und Abbildung 3.

Tab.1

| Experimentelle Mischungen | vor Absorption | | | nach Absorption | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Serum A (Anti-Typ1) mit Serum B (Anti-Typ2) | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ |
| Anti-Typ1 100% | 3,55 | 2,90 | +0,65 | 2,94 | 2,51 | +0,43 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 80:20 | 3,27 | 2,99 | +0,28 | 2,46 | 2,38 | +0,08 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 50:50 | 3,17 | 2,99 | +0,18 | 2,41 | 2,91 | -0,50 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 20:80 | 2,87 | 2,79 | +0,08 | 2,19 | 2,51 | -0,32 |
| Anti-Typ2 100% | 2,97 | 3,03 | -0,06 | 2,26 | 2,99 | -0,73 |
| Serum C (Anti-Typ1) mit Serum D (Anti-Typ2) | | | | | | |
| Anti-Typ1 100% | 3,38 | 2,89 | +0,49 | 2,88 | 2,19 | +0,69 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 80:20 | 3,60 | 3,20 | +0,40 | 3,11 | 2,83 | +0,28 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 50:50 | 3,74 | 2,61 | +0,13 | 2,74 | 2,91 | -0,17 |
| Anti-Typ1 : Anti-Typ 2 = 20:80 | 3,75 | 3,72 | +0,03 | 2,81 | 3,20 | -0,39 |
| Anti-Typ2 100% | 3,75 | 3,69 | +0,06 | 2,81 | 3,29 | -0,48 |

Untersuchungen von experimentellen Mischungen von Kaninchen-Hyperimmunseren im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1.

Abb.3




Untersuchung von experimentellen Mischungen von Kaninchen-Hyperimmunseren im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1

Erwartungsgemäß ergaben die Differenzen der $p_N$-Werte eine klar absteigende Linie von den reinen Anti-Typ1-Seren über die verschiedenen Mischungsverhältnisse bis zu den Anti-Typ2-Seren, sowohl vor als auch nach der Absorption. Es ist bekannt, daß ein reines Typ1-Antiserum HSV-Typ1 um 1,5 bis 3 Titerstufen besser neutralisiert als HSV-Typ2, und daß Anti-Typ2-Serum beide Virustypen etwa gleich gut neutralisiert. In dem hier beschriebenen Versuch neutralisierte das Anti-Thea-Serum vor der Absorption HSV-Typ1 um mehr als 2 Titerstufen besser als HSV-Typ2; das Anti-Rup-Serum neutralisierte HSV-Typ1 nur um etwa 1,5 Titerstufen besser als HSV-Typ2.

Entsprechend verhielten sich die Anti-Typ2-Seren:
Das Anti-Haase Serum neutralisierte HSV-2 nur wenig besser als HSV-1, das Anti-Schat-Serum neutralisierte HSV-1 noch ein wenig besser als HSV-2.Tabelle 1 sowie Abbildung 3 zeigen weiter, daß - übereinstimmend bei beiden Serumpaaren - von einem bestimmten Mischungsverhältnis an, nämlich der Mischung zu gleichen Teilen Anti-Typ1- und Anti-Typ2-Serum, die $\Delta p_N$-Werte nach Absorption in den negativen Bereich fallen, das heißt, die Seren bzw. experimentellen Serummischungen neutralisierten von diesem Mischungsverhältnis an HSV-Typ2 besser als HSV-Typ1, womit eindeutig HSV-2-Antikörper erfaßt waren. Die entsprechenden Werte bei den nicht absorbierten Serummischungen lagen bei $\Delta p_N < 0{,}2$, so daß wir nach diesen Modellversuchen glaubten, in nicht absorbierten Patientenseren HSV-2-Antikörper annehmen zu können, wenn sich eine $p_N$-Differenz $< 0{,}2$ ergab.

Uns interessierte nun die Frage, ob sich diese Annahme bestätigte, wenn Seren verschiedener Patientengruppen vor und nach der Absorption mit HSV-Typ1 gestestet würden.
Zuerst untersuchten wir eine Gruppe von Kinderseren.

## 4.2. Untersuchung von Kinderseren

Es wurden 85 Kinderseren auf Antikörper gegen HSV getestet (vergl. Tab.2 und Abb.4). Von den 32 HSV-Antikörper-positiven Kindern waren 11 Mädchen, 21 Jungen. Das Durchschnittsalter

der Antikörper-positiven Jungen betrug 8,1 Jahre, das der Mädchen 9,1 Jahre. 53 Kinder wiesen keinen Titer, der über 1:10 lag, auf, was im folgenden als Antikörper-negativ bezeichnet wird.

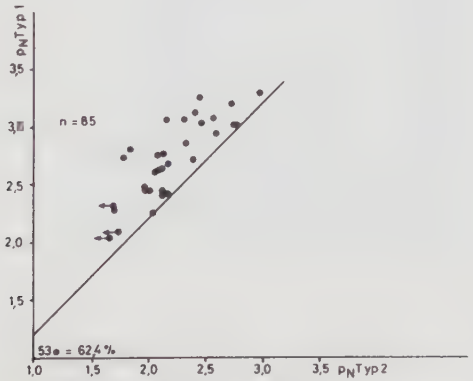
Das Durchschnittsalter der Antikörper-negativen Mädchen betrug 8,9 Jahre, das der Antikörper-negativen Jungen 7,7 Jahre. Es war zu erwarten, daß die Durchseuchungsrate mit HSV mit zunehmendem Alter ansteigt; das Durchschnittsalter der Antikörper-positiven Kinder war dementsprechend höher als das der Antikörper-negativen. Auffallend war, daß die Anzahl der Antikörper-positiven Jungen die der Antikörper-positiven Mädchen übertraf, obwohl das Durchschnittsalter der Mädchen etwas höher lag.

Tab.2

| | gesamt | Durchschn.-alter (Jahre) | Mädchen | Durchschn.-alter (Jahre) | Jungen | Durchschn.-alter (Jahre) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| auf HSV-Antikörper getestet | 85 | 8,4 | 39 | 9,0 | 46 | 7,9 |
| HSV-Antikörpertiter größer als 1:10 | 32 | 8,6 | 11 | 9,1 | 21 | 8,1 |
| HSV-Antikörpertiter kleiner als 1:10 | 53 | 8,3 | 28 | 8,9 | 25 | 7,7 |
| $\Delta p_N$ vor Absorption über 0,2 | 32 | | 11 | | 21 | |
| $\Delta p_N$ vor Absorption unter 0,2 | 0 | | 0 | | 0 | |
| absorbiert | 15 | | 4 | | 11 | |
| davon nicht auswertbar | 5 | | 1 | | 4 | |
| $\Delta p_N$ nach Absorption über 0,00 | 10 | | 3 | | 7 | |

Übersicht der untersuchten Kinderseren

Abb.4




Antikörper gegen Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 in Seren von Kindern bis zu 13 Jahren

Die Ergebnisse der Antikörpertypisierung gehen aus Tabelle 3 und Abbildung 4 und 5 hervor. Da der Titer gegen HSV gerichteter Antikörper durch die Absorption mit HSV-Typ1 ganz allgemein abnimmt, ist es nicht verwunderlich, daß gerade die Seren, die schon vor Absorption relativ niedrige $p_N$-Werte aufwiesen, nach der Absorption häufig Titer hatten, die unter 1:4 lagen, also nicht auszuwerten waren. Obwohl zur Absorption die Seren ausgewählt wurden, die die höchsten Titer hatten, war dies doch noch bei 5 von 15 Seren der Fall. Bei den 10 auswertbaren Kinderseren nahm der $p_{N1}$-Wert durch die Absorption im arithmetischen Mittel um 1,06 ab, der $p_{N2}$-Wert um 0,92.

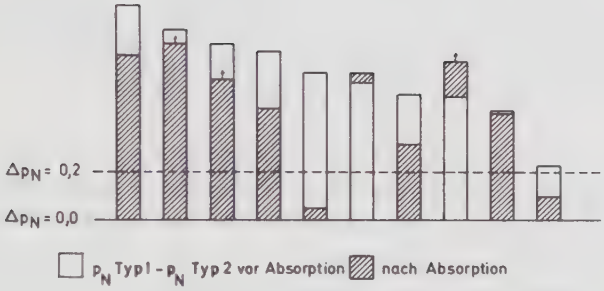
Obwohl also die $p_{N1}$-Werte etwas mehr abnahmen als die $p_{N2}$-Werte, trat jedoch 3 mal der Fall ein, daß der Antikörpertiter gegen Typ 2 allein unter 1:4 lag. Das ist erklärlich dadurch, daß die $p_{N1}$-Werte vor der Absorption im Schnitt bei 2,99 lagen, die $p_{N2}$-Werte jedoch nur bei 2,38. Die $p_{N2}$- und $\Delta p_N$-Werte sind dann in der Tabelle 3 mit dem Vorzeichen "$\leq$" bzw. "$\geq$" versehen und in der Abbildung 5 durch einen Pfeil angedeutet.

Tab. 3

| Serum-Nr. | vor Absorption | | | nach Absorption | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ |
| 2720 | 3,06 | 2,16 | +0,90 | 2,13 | 1,44 | +0,69 |
| 589 | 3,25 | 2,45 | +0,80 | 1,87 | $\leq$ 1,16 | $\geq$0,74 |
| 512 | 3,06 | 2,32 | +0,74 | 1,63 | $\leq$ 1,04 | $\geq$0,59 |
| 2352 | 3,12 | 2,41 | +0,71 | 2,21 | 1,74 | +0,47 |
| 2969 | 2,76 | 2,14 | +0,62 | 1,82 | 1,77 | +0,05 |
| 1059 | 3,03 | 2,45 | +0,58 | 2,61 | 1,99 | +0,62 |
| 6049 | 2,62 | 2,09 | +0,53 | 1,36 | 1,04 | +0,32 |
| 2186 | 2,85 | 2,33 | +0,52 | 1,91 | $\leq$1,24 | $\geq$0,67 |
| 6037 | 3,19 | 2,73 | +0,46 | 2,39 | 1,94 | +0,45 |
| 383 | 3,00 | 2,77 | +0,23 | 1,40 | 1,30 | +0,10 |

Untersuchung der Seren von Kindern bis zu 13 Jahren im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1.

Abb.5




Untersuchung der Seren von Kindern bis zu 13 Jahren im Mikro - Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1

## 4.3. Untersuchungen der Seren von Collumcarcinom-Patientinnen

Es wurden 83 Seren von Collum-Carcinom-Patientinnen getestet. Ohne nachweisbare Antikörper gegen HSV waren nur 2 Seren, 81 dagegen wiesen Antikörper auf. Dieser im Vergleich zu den Kinderseren hohe Durchseuchungsgrad steht in Übereinstimmung mit früheren Berichten, nach denen die Durchseuchung mit HSV im frühen Kindesalter gering, im Erwachsenenalter dagegen 80 - 95 %, je nach Patientenkollektiv, beträgt (Nahmias u. Mitarb., 1970; Petersen u. Mitarb., 1972; Haag u. Schneweis, 1975).

Von den verbleibenden 81 CCa-Seren wiesen 56 eine $p_N$-Differenz, die über 0,2 lag, auf, 25 hatten ein $\Delta p_N$ unter 0,2. Absorbiert wurden insgesamt 35 CCa-Seren; die erste Gruppe enthielt 23 Seren mit $\Delta p_N$-Werten über 0,2, die zweite 12 Seren mit $\Delta p_N$-Werten unter 0,2 (vergl. Tab.4).

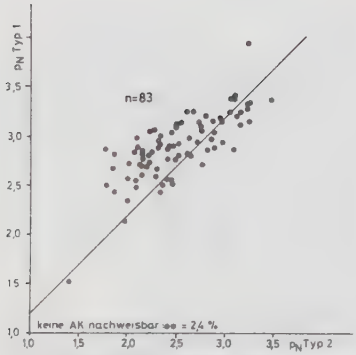
In den beiden Gruppen war je ein Serum nach Absorption nicht auswertbar, da der Antikörpertiter sowohl gegen HSV-Typ1 als auch Typ2 unter 1:4 gesunken war. In der zweiten Gruppe lagen die $\Delta p_N$-Werte nach Absorption alle unter 0,00. In der ersten Gruppe, deren Werte vor Absorption über 0,2 gelegen hatten, lagen von den 22 auswertbaren Seren 2 Seren nach Absorption mit ihrem $\Delta p_N$-Wert unter 0,00 (Abb.6 u. 7; Tab.5, 6, 7). Bei den Kinderseren mit $\Delta p_N$-Werten über 0,2 vor Absorption lag, wie weiter oben ausgeführt, kein Serum nach Absorption unter 0,00. Dieses Ergebnis wird in der Diskussion noch näher besprochen.

Tab.4

| | Seren, die ohne Abs. untersucht wurden | Seren, die auch nach Abs. untersucht wurden | nach der Abs. auswertbar | $p_N$ nach der Abs. $<0,00$ |
|---|---|---|---|---|
| gesamt | 83 | 35 | 33 | 13 |
| davon keine HSV-Ak. | 2 | / | / | / |
| $\Delta p_N$ vor Abs. $>0,2$ | 56 | 23 | 22 | 2 |
| $\Delta p_N$ vor Abs. $<0,2$ | 25 | 12 | 11 | 11 |

Übersicht der untersuchten Seren von 83 Collumcarcinom-Patientinnen

Abb.6




Antikörper gegen Herpes-simplex-Virus Typ 1 und Typ 2 in Seren von Collumcarcinom-Patientinnen im Mikro-Neutralisationstest

Tab.5

| Serum Nr. | vor Absorption | | | nach Absorption | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $P_{N_1}$ | $P_{N_2}$ | $\Delta P_N$ | $P_{N_1}$ | $P_{N_2}$ | $\Delta P_N$ |
| 84 | 3,29 | 2,17 | +1,12 | 2,17 | 1,29 | +0,88 |
| 42 | 2,81 | 1,85 | +0,96 | 1,55 | ≤1,41 | ≥+0,14 |
| 58 | 3,05 | 2,21 | +0,84 | 2,32 | ≤1,26 | ≥+1,06 |
| 83 | 3,11 | 2,33 | +0,78 | 1,94 | ≤1,14 | ≥+0,80 |
| 70 | 2,72 | 2,00 | +0,72 | 2,07 | ≤1,20 | ≥+0,87 |
| 88 | 3,94 | 3,22 | +0,72 | 2,34 | 2,06 | +0,28 |
| 40 | 3,11 | 2,49 | +0,67 | 2,11 | 1,95 | +0,16 |
| 43 | 3,00 | 2,33 | +0,67 | 1,95 | 1,71 | +0,24 |
| 78 | 2,95 | 2,31 | +0,64 | 1,55 | ≤1,28 | ≥+0,22 |
| 60 | 3,25 | 2,60 | +0,60 | 2,57 | 2,32 | +0,25 |
| 74 | 3,04 | 2,44 | +0,60 | 2,31 | 2,13 | +0,18 |

Untersuchung der Seren von Patientinnen mit Carcinoma colli uteri im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1.

Tab.6

| Serum-Nr. | vor Absorption | | | nach Absorption | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $P_{N_1}$ | $P_{N_2}$ | $\Delta P_N$ | $P_{N_1}$ | $P_{N_2}$ | $\Delta P_N$ |
| 1 | 2,92 | 2,32 | +0,60 | 1,47 | ≤1,41 | ≥+0,06 |
| 94 | 2,81 | 2,21 | +0,60 | 2,46 | ≤1,27 | ≥+1,19 |
| 52 | 2,69 | 2,19 | +0,50 | 2,15 | 1,88 | +0,27 |
| 82 | 2,99 | 2,52 | +0,47 | 1,37 | ≤1,14 | ≥+0,23 |
| 97 | 3,21 | 2,79 | +0,42 | 2,24 | ≤1,14 | ≥+1,10 |
| 67 | 3,14 | 2,72 | +0,32 | 1,55 | 1,17 | +0,38 |
| 51 | 3,40 | 3,09 | +0,31 | 3,02 | 3,20 | -0,18 |
| 35 | 3,39 | 3,09 | +0,30 | 2,30 | 2,55 | -0,25 |
| 34 | 3,39 | 3,09 | +0,30 | 2,52 | 2,28 | +0,24 |
| 32 | 3,19 | 2,94 | +0,25 | 2,85 | 2,72 | +0,13 |
| 38 | 3,33 | 3,11 | +0,22 | 2,85 | 2,82 | +0,03 |

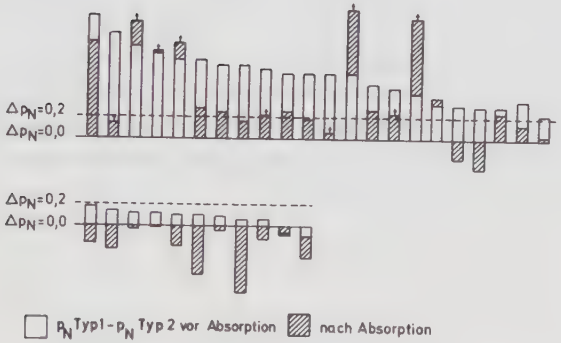
Untersuchung der Seren von Patientinnen mit Carcinoma colli uteri im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ 1.

Tab. 7

| Serum-Nr. | vor Absorption | | | nach Absorption | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ | $p_{N_1}$ | $p_{N_2}$ | $\Delta p_N$ |
| 122 | 3,20 | 3,01 | +0,19 | 1,46 | 1,62 | -0,16 |
| 57 | 3,04 | 2,88 | +0,16 | 2,45 | 2,66 | -0,21 |
| 31 | 3,34 | 3,33 | +0,12 | 2,91 | 2,94 | -0,03 |
| 113 | 2,97 | 2,85 | +0,12 | 1,84 | 1,84 | ±0,00 |
| 49 | 3,35 | 3,25 | +0,10 | 3,01 | 3,19 | -0,18 |
| 79 | 3,25 | 3,15 | +0,10 | 1,65 | 2,09 | -0,44 |
| 68 | 2,42 | 2,33 | +0,09 | 1,45 | 1,49 | -0,04 |
| 2 | 2,87 | 2,81 | +0,06 | 1,56 | 2,17 | -0,61 |
| 80 | 3,28 | 3,22 | +0,06 | 2,45 | 2,57 | -0,12 |
| 50 | 3,38 | 3,46 | -0,08 | 2,90 | 2,96 | -0,06 |
| 129 | 3,15 | 3,24 | -0,09 | 2,70 | 2,99 | -0,29 |

Untersuchung der Seren von Patientinnen mit Carcinoma colli uteri im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ I.

Abb. 7




Untersuchung der Seren von Patientinnen mit Carcinoma-colli uteri im Mikro-Neutralisationstest vor und nach der Absorption mit HSV Typ I

## 4.4. Die methodische Fehlerbreite bei mehrfacher Untersuchung des gleichen Serums

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse unserer Versuchsreihe auf Fehlerbreite und Reproduzierbarkeit untersucht.

### 4.4.1. Mehrfache Untersuchung von zwei Seren an einem Tag; Fehlerbreite

Um einen Eindruck über das Ausmaß der Fehlerbreite beim MNT zu gewinnen, wurden die Versuche unternommen, bei denen der gleiche Ansatz sechsfach durchgeführt wurde. Da hierbei Verschiedenheiten der Zellkulturen keine Rolle spielen, sind die Differenzen bei den Ergebnissen Ausdruck der technisch bedingten Fehlerbreite. Aus der Tab.8 und Abb.8 erkennt man, daß sowohl bei $p_N$-Werten wie auch $p_N$-Differenzen Abweichungen um 0,2 vorkommen können.

### 4.4.2. Reproduzierbarkeit

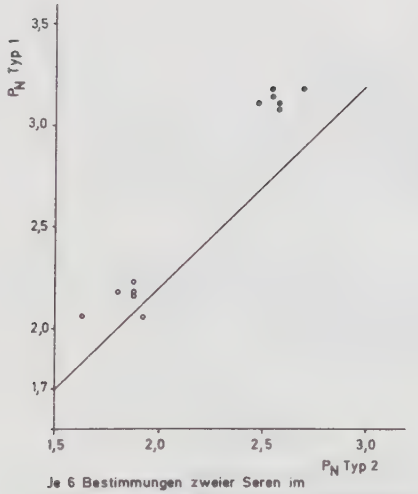
Aus allen Abweichungen der $\Delta p_N$-Werte, die sich jeweils aus mehrmaligen Untersuchungen ein und desselben Serums ergaben, wurde der Mittelwert gebildet. 18 Seren waren je zweimal, 6 Seren je dreimal und 1 Serum viermal untersucht worden. Dabei handelte es sich nicht um speziell zu diesem Zweck ausgeführte Wiederholungen von Untersuchungen, sondern um solche, die aus Gründen der schlechten Auswertbarkeit der ersten Versuche wegen mangelhaften Wachstums der Zellkulturen wiederholt wurden.

Tab.8

| Platten-Nr. | log. Virus-titer HSV-1 | log. Virus-titer HSV-2 | $P_{N_1}$ | $P_{N_2}$ | $\Delta p_N$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1,60 | 2,24 | 3,18 | 2,70 | +0,48 |
| 2 | 1,60 | 1,75 | 3,08 | 2,58 | +0,50 |
| 3 | 2,00 | 1,75 | 3,14 | 2,55 | +0,59 |
| 4 | 1,60 | 1,60 | 3,11 | 2,48 | +0,63 |
| 5 | 1,75 | 1,75 | 3,18 | 2,55 | +0,63 |
| 6 | 1,75 | 1,75 | 3,11 | 2,58 | +0,53 |
| 7 | 1,60 | 2,24 | 2,06 | 1,92 | +0,14 |
| 8 | 1,60 | 1,75 | 2,18 | 1,88 | +0,30 |
| 9 | 2,00 | 1,75 | 2,16 | 1,88 | +0,28 |
| 10 | 1,60 | 1,60 | 2,06 | 1,64 | +0,42 |
| 11 | 1,75 | 1,75 | 2,23 | 1,88 | +0,35 |
| 12 | 1,75 | 1,75 | 2,18 | 1,80 | +0,38 |

6 Bestimmungen des Serums der Pat. Z. (1-6) und
6 Bestimmungen des Serums der Pat. K. (7-12) im
Mikro-Neutralisationstest in einem Versuchsansatz

Abb.8




Je 6 Bestimmungen zweier Seren im
Mikro-Neutralisationstest in einem Versuchsansatz

• Serum der Pat. Z.
○ Serum der Pat. K.

Es ergaben sich folgende Werte:

$$M = \frac{\sum I}{n} = 0{,}21$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = \pm 0{,}154$$

M = arithm. Mittel

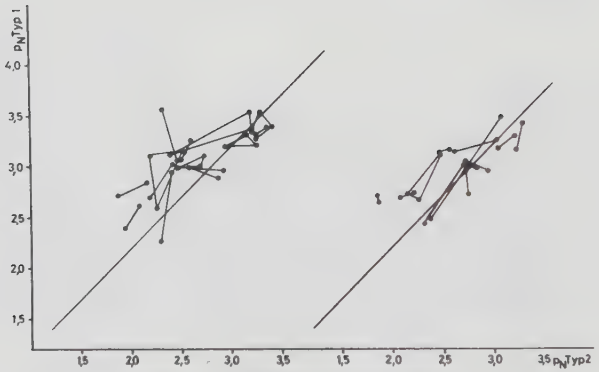
I = Einzelabweichungen

n = Anzahl der Einzelabweichungen

$\sigma$ = Standardabweichung des Mittelwertes

d = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert

Abb.9



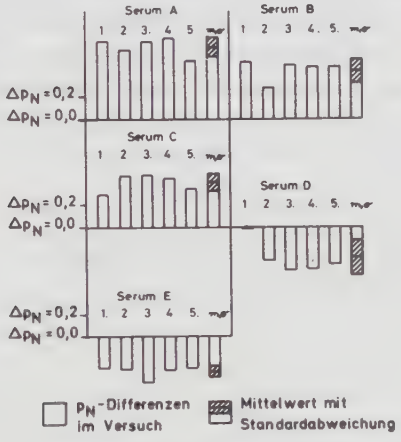

Fehlerbreite bei der Herpesvirus-Antikörper-Typisierung im Mikro-Neutralisationstest

Die größte Abweichung eines Einzelwertes vom Mittelwert liegt definitionsgemäß nicht im $\pm \sigma$-Bereich; sie betrug 0,43. Die größte Abweichung zweier Einzelwerte voneinander betrug 0,64.

Abbildung 9 zeigt, daß bei der mehrmaligen Untersuchung von Seren zwar die Schwankungsbreite in der ansteigenden Diagonalen überwiegt, was auf den Einfluß des Faktors Zellsystem hinweist; die $p_N$-Differenzen, die für die Typisierung der Antikörper entscheidend sind, werden dabei nur wenig verändert. Es kommen aber auch Abweichungen in der absteigenden Diagonalen vor, die sich wesentlich auf das Typisierungsergebnis auswirken.

Innerhalb einer anderen Untersuchung aus diesem Institut (Haag und Schneweis, 1975) wurde die Frage der Reproduzierbarkeit in speziell zu diesem Zweck vorgenommenen Versuchsansätzen untersucht und führte zu einem günstigereren Ergebnis (Abbildung 10):

Abb.10




Fehlerbreite bei der Herpes Virus -Antikörper - Typisierung im Mikro - Neutralisationstest

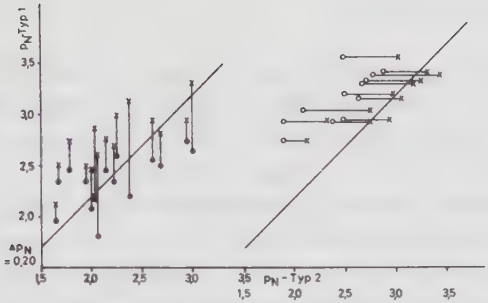
Vier von den jeweils fünfmal untersuchten Seren weisen Standardabweichungen auf, die unter der Standardabweichung der erstgenannten Untersuchung liegen. Wichtiger jedoch scheint noch zu sein, daß hier kein Serum im Verlauf fünfmaliger Untersuchungen die Grenze von 0,2 überschritt, also entweder alle fünf $p_N$-Wert-Differenzen für jedes Serum liegen ober- oder unterhalb von 0,2.

## 4.5. Einfluß von inaktivem Virus auf den MNT

Jede Herpesviruspräparation enthält 10 bis 100 mal mehr inaktives Virus als aktives Virus (Figueroa u. Mitarb., 1969). In der Praxis des MNT wird der Anteil an inaktivem Virus bei der Titerbestimmung der Viruspräparation nicht miterfaßt, denn er ruft ja keinen CPE hervor. Neutralisierende Antikörper werden aber auch an inaktives Virus gebunden (Schneweis, 1962), so daß von dem inaktiven Virus ein entscheidender Einfluß auf das Ergebnis des MNT zu erwarten ist. Das sollte in Modellversuchen gezeigt werden. Eine Anzahl von Seren, von denen die meisten im Bereich $\Delta p_N > 0{,}2$ lagen, wurden so untersucht, daß jeder Verdünnungsstufe 1.) Typ-1-Virus in Gebrauchsverdünnung, 2.) Typ-2-Virus in Gebrauchsverdünnung und 3.) Typ-1-Virus in Gebrauchsverdünnung plus $10^6$ Einheiten UV-inaktiviertes Typ-1-Virus zugesetzt wurde. Entsprechend wurde eine Anzahl von Seren, von denen die meisten im Bereich $\Delta p_N < 0{,}2$ lagen, untersucht. Hier bestand der dritte Viruszusatz aus Typ-2-Virus plus UV-inaktiviertem Typ-2-Virus.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 dargestellt.

Abb.11




Mikro-NT gegen HSV-1 u. HSV-2:
x ohne Zusatz von inakt. Virus
● mit Zusatz von $10^6$ Einheiten inakt. HSV-1 zu $10^2$ $JD_{50}$ HSV-1
○ mit Zusatz von $10^6$ Einheiten inakt. HSV-2 zu $10^2$ $JD_{50}$ HSV-2

Die Ablenkung der jeweiligen Antikörper war immerhin so beträchtlich, daß die $p_N$-Wert-Differenzen dann, wenn sie ohne Zusatz von inaktivem Virus $>0,2$ gelegen waren, mit Zusatz von inaktivem Virus meist $<0,2$ lagen und umgekehrt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Der MNT sowie die Bildung der $p_N$-Differenzen im Vergleich zu anderen Methoden zur Bestimmung des Herpes simplex Virus-Antikörpertyps.

Der MNT mit den beiden HSV-Typen und die Auswertung über die $p_N$-Differenzen ist zur Zeit die beste Methode, um HSV-Typ2-Antikörper in Patientenseren zu erfassen.

5.1.1. Bestimmung von HSV-2 Antikörpern durch Neutralisationskinetik allein mit HSV-2.
Bei diesem Vorgehen (Rawls u. Mitarb., 1968; 1969) werden die Seren 1:8 verdünnt, mit 5 x $10^5$ PFU (plaque forming units) HSV-Typ2 gemischt und das Gemisch 2 Min. bei 37° C inkubiert; Titration der Rest-Aktivität des Virus und Auszählen der PFU auf sekundären Kulturen von Kaninchen-Nieren-Zellen schließt sich an. Die Auswertung erfolgt durch Berechnung einer Konstanten K (k-value bzw. velocity constant) nach Mc. Bride (1959):

$$K = \frac{2,3}{t} \times \log \frac{p_o}{p_t}$$

$2,3$ = Konstante
$t$ = Zeit ab Zeit $t_o$
$p_o$ = Viruskonzentration zur Zeit $t_o$
$p_t$ = Viruskonzentration zur Zeit $t$

Die Autoren, die diese Methode anwenden (Rawls u. Mitarb., 1968 und 1969; Sprecher-Goldberger u. Mitarb., 1970 und 1973), gehen von der Voraussetzung aus, daß nur HSV-Typ2-Antikörper zu einer beschleunigten Neutralisation von HSV-2 führen. Sie berücksichtigen dabei nicht, daß hochtitrige HSV-1-Antikörper aufgrund der kreuzreagierenden Antigene ebenfalls eine beschleunigte Neutralisation von HSV-2 zur Folge haben. Auch bei der Neutralisationskinetik muß daher die Neutralisation von HSV-1 und HSV-2 mit einander verglichen werden.

5.1.2. Bestimmung des Antikörpertyps durch den Plaque-Reduktions-Test (Rawls u. Mitarb., 1970; Royston u. Aurelian, 1970)

Die neutralisierenden Antikörper werden dadurch ermittelt, daß eine konstante Virusdosis mit unterschiedlichen Serumverdünnungen zusammengebracht wird und die Serumverdünnung ermittelt wird, die eine 90 %ige Reduktion des infektiösen Virus hervorruft.

Bei dieser Methode werden Serumverdünnungen in $\log_2$-Stufen, beginnend mit 1:10, hergestellt und in parallel laufenden Ansätzen mit einem gleichen Volumen 1000 PFU/ml enthaltenden Virusverdünnung von HSV-1 bzw. HSV-2 zusammengebracht (je 0,4 ml). Nach einer Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur werden mit 0,2 ml der Mischung Monolayers von Kaninchennierenzellen inokuliert, zwei Platten pro Verdünnungsstufe. Nach einer Stunde Adsorption bei Raumtemperatur werden die Zellkulturen mit Eagle-Medium versorgt.

Nach 4 Tagen Inkubation bei $37^{\circ}$ C werden die Plaques der Testplatten sowie parallel mitgeführter Kontrollen ausgezählt. Die Serumverdünnung, die das überlebende Virus auf 10 % der Kontrollwerte reduziert hat, wird nach Reed und Muench (1938) ausgerechnet und in $\log_{10}$ ausgedrückt. Zur Klassifizierung der Testseren bedienten sich die Autoren des Quotienten $\frac{\log \text{ Antikörpertiter gegen Typ2}}{\log \text{ Antikörpertiter gegen Typ1}} \times 100 = \text{II/I-Index}$, derselben Formel, auf die noch im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Seren mit fehlender Aktivität gegen beide HSV-Typen bei der Verdünnung 1:10 wurden als Antikörper-frei bezeichnet.

Die Grenze, von der ab ein Serum als Anti-Typ2-Serum klassifiziert wurde, richtete sich nach Mittelwert und Standardabweichung der Seren von Patientinnen mit genitalen Herpes-Erkrankungen. Die Methode ist relativ aufwendig, denn sie erfordert mindestens 28 Kulturplatten pro Serum, so daß nur eine sehr begrenzte Zahl von Seren gleichzeitig untersucht werden kann.

Eine Sonderform dieser Methode wurde von Ejercito und Mitarbeitern (1968) entwickelt und von Royston und Aurelian (1970)

bei der Antikörpertypisierung angewendet. Diese Autoren nutzten die besonderen morphologischen Eigenschaften einer Herpes-Virus-Mutante, die von einem HSV-1 Stamm abgeleitet worden war, statt der üblichen kleinen Rundzell-Herde (Mikroplaques (mP)) aber große syncytiale Herde hervorruft (Makroplaques (MP)).

Bei der Neutralisation experimenteller Mischungen dieses Stammes mit einem HSV-2 Stamm kann die neutralisierende Wirkung eines Serums gegen beide HSV-Typen in einem Ansatz ermittelt werden, da sich die Plaques von HSV-1 (MP) und HSV-2 morphologisch unterscheiden und daher getrennt ausgezählt werden können.

5.1.3. Präferenz der Differenzen der $p_N$-Werte

Im MNT und im Plaque-Reduktionstest bestehen zwei Möglichkeiten zur Auswertung der Neutralisation von HSV-1 und HSV-2:

a) die Bildung des II/I-Indexes unter Zuhilfenahme der Formel, die unter 5.1.2. (Rawls u. Mitarb., 1970) genannt ist, oder

b) die Ermittlung der $\Delta p_N$-Werte als Differenz der Neutralisationspotenz eines Serums gegen Typ 1 ($p_{N1}$) und Typ 2 ($p_{N2}$) (s. Methodik). Die Differenz der Titerlogrithmen erscheint uns als das richtigere Maß gegenüber dem Quotienten der Titerlogrithmen, da letzterer zu verschiedenen Ergebnissen führt, wenn die Antikörper gegen beide HSV-Typen zwar im gleichen Verhältnis zueinander stehen, aber bei beiden Typen mit niedrigeren oder höheren Titern vorliegen.

Von vielen Untersuchern werden die Titerlogarithmen der Berechnung zugrunde gelegt (Rawls u. Mitarb., 1970; Adam u. Mitarb., 1972; Petersen u. Mitarb., 1972). Demgegenüber ist die Bildung des $p_N$-Wertes deshalb von Vorteil, weil bei der Berechnung der $p_N$-Werte zusätzlich der im jeweiligen Versuchsansatz aktuelle Virustiter mit einbezogen wird.

## 5.2. Theoretische und experimentelle Grundlagen zur Bestimmung des Herpes simplex Virus-Antikörper-Typs.

Eine zentrale Stellung nimmt die Frage ein, von welchem $\Delta p_N$-Wert Antikörper gegen HSV-Typ2 als nachgewiesen gelten sollten. Nahmias und Mitarbeiter (1969) immunisierten Kaninchen mit HSV Typ1 und 2, und zwar drei Gruppen: Je eine Gruppe von Kaninchen wurde mit HSV Typ1 oder 2 allein beimpft, die dritte Gruppe nach Injektion mit dem einen oder anderen Typ mit jeweils dem heterologen Typ. Der Versuchsanordnung entsprechend ergaben sich bei den Ergebnissen drei Gruppen:

1.) die auswertbaren MNTs der Kaninchen, die nur mit HSV Typ1 inokuliert waren, lagen in ihren $\Delta p_N$-Werten über + 0,5;
2.) die entsprechenden Untersuchungen in der HSV Typ2-inokulierten Gruppe ergaben $\Delta p_N$-Werte, die unter + 0,05 lagen;
3.) nach einer Injektion des einen oder des anderen Typs, der wiederholte Injektionen des heterologen Typs folgten, lagen die $\Delta p_N$-Werte in einem "intermediären Bereich", d.h. zwischen + 0,05 und + 0,5.

Da nach diesen Versuchen reine Anti-Typ1-Seren nie unter + 0,5 lagen, Seren mit mindestens einem Teil gegen Typ2 gerichteten Antikörpern aber immer unter 0,5 lagen, wurde die Grenze, unterhalb derer Typ2-Antikörper als nachgewiesen gelten, bei + 0,5 festgesetzt.

Eigene Untersuchungen ergaben, daß dieser Wert unter den jeweiligen Versuchsbedingungen neu angepaßt werden muß. Es ist nämlich zu erwarten, daß ein Serum, das mit Sicherheit Antikörper gegen HSV-Typ2 enthält, nach Absorption mit HSV-1 einen HSV-Typ2-Stamm besser neutralisiert als einen Typ1-Stamm, d.h., einen $\Delta p_N$-Wert aufweist, der unter 0,00 liegt. Wie die Tabelle 1 zeigt, war dies in unserer Versuchsanordnung erst der Fall, wenn das Serum vor Absorption einen $\Delta p_N$-Wert von $< 0,2$ aufwies. Bei $\Delta p_N$-Werten unter 0,2 konnten daher bei uns Antikörper gegen Typ 2 als nachgewiesen gelten, über 0,2 nicht. Unterstützt wurde diese Grenzziehung für unsere Versuchsreihe durch die Tatsache, daß unsere Kinder-

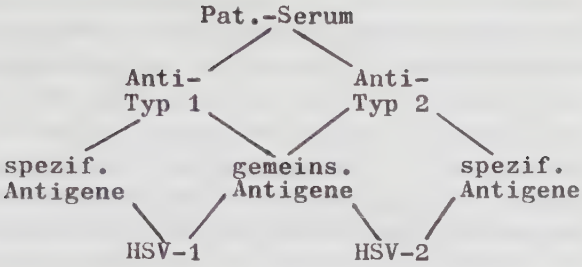
seren vor Absorption $\Delta p_N$-Werte von über 0,2 aufwiesen und nach Absorption im positiven Bereich blieben, d.h., daß bei ihnen keine Antikörper gegen Typ 2 nachgewiesen werden konnte

Hätten wir dagegen die Grenze bei 0,5 gezogen, hätten bei 10 von den 32 HSV-Antikörper-positiven Kindern HSV-Typ2-Antikörper als nachgewiesen gelten müssen, ein Ergebnis, welches der Erfahrung widersprechen würde, daß Kinder - abgesehen vom recht seltenen Neugeborenen-Herpes - nur mit HSV-1 infiziert sind.

Die Grenze von 0,2 zeigt auf der anderen Seite durch die experimentellen Mischungen von Immunseren, daß der Nachweis von HSV-Typ2-Antikörpern im Einzelfall nicht gelingt, wenn die Typ1-Antikörper mindestens vierfach stärker vertreten sind als die gegen Typ 2; so wiesen beide Mischungspaare bei einem Verhältnis von Antiserum-Typ 1 : Antiserum-Typ 2 wie 80 : 20 $\Delta p_N$-Werte auf, die vor der Absorption mit HSV-1 über 0,2 bzw. nach der Absorption über 0,00 lagen; erst von dem Mischungsverhältnis zu gleichen Teilen Anti-Typ-1- und Anti-Typ-2-Serum fielen die $\Delta p_N$-Werte nach Absorption in den negativen Bereich.

Zur Erklärung dieses Sachverhaltes dient folgende Überlegung:
Bei der Absorption bindet das zugegebene HSV-Typ1-Virus mit antigenen Determinanten, die zu einem Teil spezifisch für Typ1 sind, zum anderen Teil Typ1 und Typ2 gemeinsam sind (s. Abbildung 12), eventuell vorhandene spezifische Typ1-Antikörper an sich, aber auch die oder einen Teil der Antikörper, die gegen die gemeinsamen antigenen Determinanten gerichtet sind, also Antikörper, die sowohl Typ1 als auch Typ2-Virus neutralisieren.

Abb.12




Damit erklärt sich die allgemeine Abnahme der $p_N$-Werte eines Serums, gleichgültig, ob es Typ1 oder Typ2 Antikörper enthält. Wenn nun der Anteil an typenspezifischen Typ-2-Antikörpern im Serumgemisch zu gering ist, wie das offenbar bei dem Mischungsverhältnis von Anti-Typ1 : Anti-Typ2 = 80 : 20 der Fall ist, werden die typenspezifischen Typ-2-Antikörper nach der Absorption entweder noch nicht nachweisbar sein, oder die neutralisierende Potenz des Serums wird bei mehrfach wiederholter Absorption unter die Nachweisbarkeitsgrenze absinken.

Worin kann nun die Bedeutung der Absorption der zu typisierenden Seren mit HSV-Typ1 liegen?

Wie weiter oben ausgeführt, hatten die Absorptionsergebnisse entscheidenden Einfluß auf die Festlegung für den Grenzwert der $p_N$-Differenzen, unterhalb dessen Typ-2-Antikörper als nachgewiesen gelten können. Mit der Absorption gelang es ferner, zwei CCa-Seren, die vor Absorption $\Delta p_N$-Werte über 0,2 aufwiesen, doch dem Typ-2-Antikörper-positiven Bereich zuzuordnen, da ihre $p_N$-Differenzen nach Absorption unter 0,0 lagen. Etwas ähnliches beobachteten wir bei den Kinderseren nicht. Ob der Absorptionsversuch in der Lage ist, die Ausbeute an Typ-2-Antikörper-positiven Seren wesentlich zu erhöhen, ist zwar wegen der geringen Zahl untersuchter Seren nicht sicher; durch die Untersuchung eines grösseren Kollektivs könnte diese Frage eventuell geklärt werden.

Die Methode der Absorption wurde auch schon von anderen Un-

tersuchern benutzt, um typenspezifisch reagierende Seren zu erhalten: Schneweis und Nahmias (1971) erhielten auf diese Weise Seren, die in der Immundiffusion vollkommen typenspezifisch reagierten und wiesen damit nach, daß bei HSV-1 und HSV-2 neben gemeinsamen Antigenen typenspezifische Antigene vorkommen. Das wurde von Jeansson (1972) bestätigt und auf die Methode der Überwanderungselektrophorese ausgedehnt. Auch Sim und Watson (1973) kamen zu dem gleichen Ergebnis und erhielten durch extrem starke Absorption Seren, die auch im Neutralisationstest nur noch mit dem homologen Virus-Typ reagierten. Jeansson (1975) berichtet in einer späteren Arbeit über eine Immunoadsorbent-Methode zur Gewinnung typenspezifischer HSV-Antiseren: Die Antiseren wurden in einem hohen Maße typenspezifisch dadurch, daß das zur kreuzweisen Absorption von Kaninchen-Immunseren benutzte heterologe Virus-Antigen vor Absorption mit Glutaraldehyd polymerisiert wurde. Mit dieser Technik soll das Auftreten löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe ausgeschlossen werden.

## 5.3. Abhängigkeit des Neutralisationstests vom Zellsystem, vom Virusstamm und von der Viruspräparation, insbesondere vom Anteil an inaktivem Virus in der Viruspräparation.

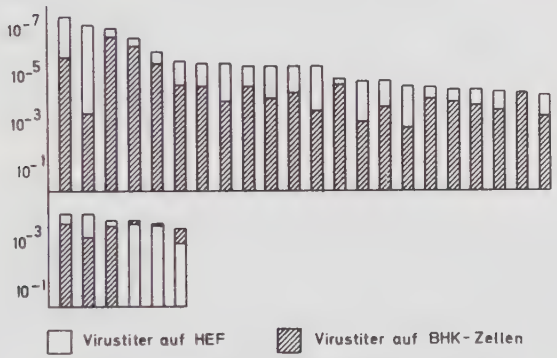
Bereits an anderer Stelle wurde darauf hingewiesen, daß ein nicht unwesentlicher Unsicherheitsfaktor im MNT beim Zellsystem liegt, das in seiner Funktion als "Indikator" das letzte Glied in einer Kette von drei biologischen Komponenten-Antigen (Virus), Antikörper (Patientenserum) und Indikator (Zellsystem) - bildet.

a) Kondition der Zellkultur:
Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich deutlich, daß das Wachstum der menschlichen embryonalen Fibroblasten mit steigender Zahl der Passagen nachließ, und daß die Kondition der Zellen darüberhinaus von zahlreichen anderen Faktoren, vor allem im Kulturmedium, abhängig war. Auch im Patientenserum können cytotoxische Substanzen vorkommen. Das zeigte sich darin, daß nur in den niedrigen

Verdünnungsstufen das Wachstum der Zellen mangelhaft war, mit steigender Verdünnungsstufe das Wachstum der Zellen jedoch besser wurde, die cytotoxische Substanz also ausverdünnt wurde.

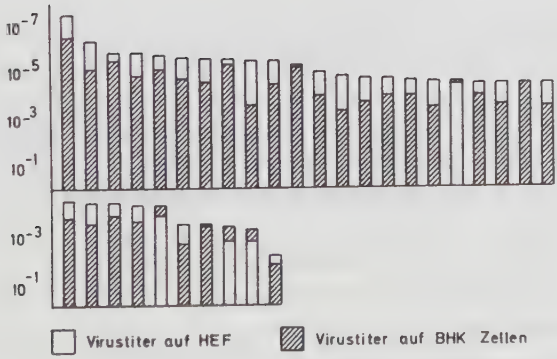
b) zelleigene Faktoren:
Daß auch zelleigene Faktoren eine Rolle spielen können, zeigen die beiden folgenden Abbildungen 13 und 14.

Abb.13




HSV Typ 1 - Stämme nach 3 Tagen Inkubation bei 36 °C

Abb.14




HSV Typ 2-Stämme nach 3 Tagen Inkubation bei 36 °C

Bei der Titerbestimmung von HSV-Stämmen wiesen in der Regel sowohl die HSV-1-Stämme als auch die HSV-2-Stämme auf menschlichen Lungenzellen einen höheren Titer auf als auf Hamsternierenzellen, d.h., derselbe Virusstamm löste bei HEF noch in größerer Verdünnung einen cytopathischen Effekt aus als in BHK-Zellen. Dieser Unterschied war bei Typ-1-Stämmen im Durchschnitt größer als bei Typ-2-Stämmen. Andererseits trat bei den 25 untersuchten Typ-1-Stämmen dreimal und bei den 26 untersuchten Typ-2-Stämmen viermal der umgekehrte Fall ein, daß nämlich der Virustiter auf BHK-Zellen größer war als auf HEF. Sowohl in der Typ-1-Stamm-Gruppe als auch in der Typ-2-Stamm-Gruppe trat je einmal der Fall ein, daß bei Stämmen, die zweimal untersucht wurden, das eine Mal auf HEF und das andere Mal auf BHK-Zellen der Virustiter höher lag.

Da mit niedrigerem Infektiositätstiter einer Viruspräparation in einem Zellsystem der Anteil des auf diesem Zellsystem inaktiven Virus zunimmt und umgekehrt, muß auch der Serumtiter entsprechend beeinflußt werden. Wenn sich die beiden Virustypen dabei nicht gleich verhalten, wird nicht nur der Serumtiter, sondern auch die $p_N$-Differenz verändert. Daraus ergibt sich, daß Bewertungsmaßstäbe, die auf einem Zellsystem gewonnen wurden, nicht ohne weiteres auf ein anderes System übertragen werden können.

Es soll an dieser Stelle noch einmal kurz auf die Problematik der exakten Bestimmung des Anteils an inaktivem Virus eingegangen werden, welcher zwar, wie weiter oben bereits erwähnt, ebenfalls neutralisierende Antikörper bindet, nicht aber einen CPE hervorruft und so bei der Titerbestimmung der Viruspräparation nicht miterfaßt wird. Die Schwierigkeit könnte theoretisch dadurch umgangen werden, daß die kompletten (enveloped) Viruspartikel - denn nur diese sind im MNT wirksam - elektronenmikroskopisch ausgezählt, und nur Präparationen einer konstanten Partikel:Infektiosität-Ratio verwendet werden. In der Praxis kann das Problem dadurch umgangen werden, daß für alle MNTs einer Untersuchungsreihe die gleichen Viruspräparationen verwendet werden. Das wurde

bei den vorliegenden Versuchen so gehandhabt. Die Viruspräparationen erlitten zwar im Laufe der Zeit einen geringen Titerverlust, dieser war aber für beide Präparationen gleich.

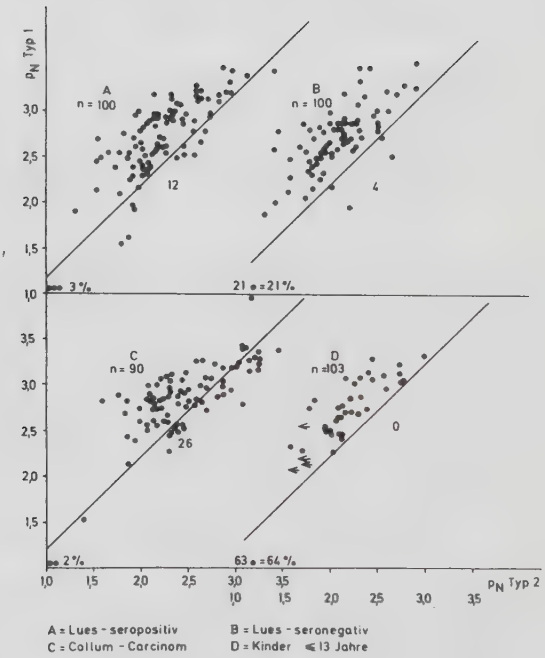
## 5.6. Gegenüberstellung der Ergebnisse von vier Versuchsreihen.

Die in der Abbildung 15 dargestellten, auf Antikörper gegen HSV untersuchten, Patientengruppen sind:

A : 100 Seren von Lues-seropositiven Patienten
B : 100 Seren von Lues-seronegativen Patienten
C : 90 Seren von Patientinnen mit Collum-Carcinom
D : 103 Seren von Kindern bis zu 13 Jahren
(A und B siehe bei Haag und Schneweis, 1975)

Ohne an dieser Stelle auf die Ergebnisse im einzelnen einzugehen, soll anhand dieser zusammenfassenden Gegenüberstellung die seroepidemiologische Bedeutung des MNT zur Antikörpertypisierung aufgezeigt werden. Unter Berücksichtigung der weiter oben diskutierten Problematik für die Festlegung des Antikörpertyps im individuellen Fall scheint doch bestätigt zu werden, was zahlreiche Untersucher vorher bereits beobachteten: daß die Zahl der Seren mit gegen HSV Typ 2 gerichteten Antikörpern bei einer Collum-Carcinom-Gruppe größer ist als bei Kontrollgruppen. Hier nehmen die Typ-2-Antikörper in der Reihenfolge: CCa-Seren (30%) - Lues-positive Seren (12%) - Lues-negative Seren (4%) - Kinderseren (0%) ab. Dieselbe Reihenfolge ergibt sich, wenn die Grenze zwischen "Typ-2-Antikörper nachgewiesen" und "nicht nachgewiesen" in Anlehnung an Nahmias bei + 0,5 gezogen wird, wobei die absoluten Zahlen dann natürlich höher liegen.

Abb.15




A = Lues - seropositiv
B = Lues - seronegativ
C = Collum - Carcinom
D = Kinder ≤ 13 Jahre

## 6. Zusammenfassung

1. Bei der Typisierung von Herpes simplex-Virusstämmen (HSV) im Mikro-Neutralisationstest (MNT) lassen sich Typ1- und Typ2-Stämme deutlich abgrenzen, die Ergebnisse bei der Typisierung von Antikörpern gehen dagegen kontinuierlich ineinander über. Zur Festlegung des Grenzwertes zwischen einem Serum mit Typ1-Antikörpern und einem Serum mit Typ2-Antikörpern wurden Modellversuche durchgeführt: Typ1- und Typ2-Immunseren wurden in verschiedenen Mischungsverhältnissen vor und nach der Absorption mit Typ1-Virus untersucht. Der Grenzwert wurde an dem Punkt festgelegt, von dem an die absorbierten Serum-Mischungen HSV-2 besser neutralisierten als HSV-1. Die Richtigkeit der ermittelten Grenzlinie wurde durch die Untersuchung der Seren von zwei Personengruppen im MNT ebenfalls vor und nach der Absorption mit Typ1-Virus überprüft:
   1. Seren von Kindern bis 13 Jahren, in denen keine Typ2-Antikörper erwartet wurden.
   2. Seren von Patientinnen mit Collumcarcinom, in denen relativ häufig Typ2-Antikörper zu erwarten waren.

   Nach Maßgabe des ermittelten Grenzwertes wurden Antikörper vom Typ2 bei den Kindern nicht nachgewiesen, bei Collumcarcinom-Patientinnen bei etwa einem Drittel der Patientinnen.

2. Die methodische Fehlerbreite des MNT war am geringsten in speziellen Versuchen, bei denen Seren an einem Tag im gleichen Versuchsansatz mehrfach untersucht wurden; sie war umso größer, je mehr sich der Einfluß der unterschiedlichen Kondition des Zellsystems auswirkte.

3. In Modellversuchen wurde der Einfluß von inaktivem Virus auf das Ergebnis des Mikro-Neutralisationstests aufgezeigt. Inaktives Virus, das in der Viruspräparation enthalten ist, lenkt die homologen Antikörper ab, so daß das Ergebnis zugunsten der heterologen Antikörper verschoben wird.

4. Unterschiedliche Titer verschiedener HSV-Stämme auf zwei verschiedenen Zellsystemen wiesen darauf hin, daß sich die Faktoren Zellsystem und Virusstamm über den Anteil des inaktiven

Virus ebenfalls auf das Ergebnis des Mikro-Neutralisationstests auswirken können.

5. Die Untersuchungen zeigten somit, daß bei der HSV-Antikörper-Typenbestimmung der Grenzwert für die jeweiligen Versuchsbedingungen (Zellsystem, Virusstämme, Viruspräparationen) neu ermittelt werden muß, und daß die hier beschriebenen Modellversuche mit künstlichen Serum-Mischungen und die Untersuchung von Kinderseren hierzu eine geeignete Methode darstellen.

## 7. Literaturverzeichnis


Adam, E.; Zeigler, S.D.; Iwamoto, K.; Melnick, J.L.; Levy, A.H.; Rawls, W.E.
Seroepidemiologic studies of Herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. II Uganda.
J. natl. Cancer Inst. 48, 65 - 72 (1972)

Adam, E.; Kaufman, R.H.; Melnick, J.L.; Levy, A.H.; Rawls, W.E.
Seroepidemiologic studies of Herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. III Houston, Texas.
Amer. J. Epidem. 96, 427 - 442 (1972)

Dowdle, W.R.; Nahmias, A.J.; Harwell, R.W.; Pauls, F.P.
Association of antigenic types of Herpesvirus hominis with site of viral recovery.
J. Immunol. 99, 974 - 980 (1967)

Ejercito, P.M.; Kieff, E.D.; Roizman, B.
Characterization of Herpes simplex virus strains differing in their effect on sozial behavior of infected cells.
J. Gen. Virology 3, 357 - 364 (1968)

Fazekas de St. Groth, S.
Evaluation of quantal neutralization tests.
Nature 191, 891 - 893 (1961)

Figueroa, M.; Rawls, W.E.
Biological markers for differentiation of Herpesvirus strains of oral and genital origin.
J. Virol. 4, 259 - 167 (1969)

Haag, A.;
Schneweis, K.E.
Korrelation zwischen positiven Lues-Seroreaktionen und Herpes simplex-Virus Typ 2- (Herpes genitalis) Antikörpern.
Hautarzt 26, 264 - 267 (1975)

Jeansson, S.
Differentiation between Herpes simplex virus type1 and type2 strains by immunoelectroosmophoresis.
Appl. Microbiol. 24, 96 - 100 (1972)

Jeansson, S.
Preparation of type specific Herpes simplex antisera by an immunosorbent method.
Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 83, 48 - 54 (1975)

Josey, W.E.;
Nahmias, A.J.;
Naib, Z.
Genital infection with type 2 Herpesvirus hominis: present knowledge and possible relation to cervical cancer.
Amer. J. Obstet. Gynec. 101, 718 - 729 (1968)

Mc Bride, W.D.
Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization.
Virology 7, 45 - 58 (1959)

Nahmias, A.J.;
Dowdle, W.E.;
Kramer, J.H.;
Luce, C.F.;
Mansour, S.C.
Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in the rabbit.
J. Immunol. 102, 956 - 962 (1969)

Nahmias, A.J.; Josey, W.E.; Naib, Z.M.; Luce, C.F.; Duffey, A.
Antibodies to Herpesvirus hominis type 1 and 2 in humans. I. Patients with genital herpetic infections. Amer. J. Epidem. 91, 539 - 546 (1970)

Nahmias, A.J.; Josey, W.E.; Naib, Z.M.; Luce, C.F.; Guest, B.A.
Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Woman with cervical cancer. Amer. J. Epidem. 91, 547 - 552 (1970)

Pauls, F.P.; Dowdle, W.R.
A serological study of Herpesvirus hominis strains by microneutralization tests. J. Immunol. 98, 941 - 947 (1967)

Petersen, E.E.; Böcker, J.F.; Fürmaier, I.; Hillemanns, H.G.
Herpes simplex-Virus Typ 2: Seine Verbreitung und seine Beziehung zum Zervix-Karzinom. Dtsch. med. Wschr. 97, 1936 - 1942 (1972)

Rawls, W.E.; Tompkins, W.A.F.; Figueroa, M.; Melnick, J.L.
Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. Science 161, 1255 - 1256 (1968)

Rawls, W.E.; Tompkins, W.A.F. Melnick, J.L.
The association of Herpesvirus type 2 and carcinoma of the uterine cervix. Amer. J. Epidem. 89, 547 - 554 (1969)

Rawls, W.E.; Iwamoto, K.; Adam, E.; Melnick, J.L.
Measurement of antibodies to Herpesvirus types 1 and 2 in woman sera. J. Immunol. 104, 599 - 606 (1970)

Rawls, W.E.;
Gardner, H.L.;
Kaufman, R.H.
Antibodies to genital Herpesvirus in patients with carcinoma of the cervix.
Amer. J. Obstet. Gynec. 107, 710 - 716 (1970)

Reed, L.J.;
Muench, H.
A simple methode of estimating fifty percent endpoints.
Amer. J. Hyg. 27, 493 - 497 (1938)

Royston, I.;
Aurelian, L.
The association of genital Herpesvirus with cervical atypia and carcinoma in situ.
Amer. J. Epidem. 91, 531 - 538 (1970)

Schneweis, K.E.;
Brandis, H.
Typendifferenzen beim Herpes simplex Virus.
Zbl. Bakt.,I. Abtl. Orig. 183, 556 - 558 (1961)

Schneweis, K.E.
Zum antigenen Aufbau des Herpes simplex Virus.
Z. Immun.-Forsch. 124, 173 - 196 (1962)

Schneweis, K.E.
Serologische Untersuchung zur Typendifferenzierung des Herpesvirus hominis.
Z. Immun.-Forsch. 124, 24 - 48 (1962)

Schneweis, K.E.
Der cytopathische Effekt des Herpes simplex Virus. Stammdifferenzen, Stabilität, Einfluß von Immunseren und Beziehungen zur Pockengröße.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 186, 467 - 494 (1962)

Schneweis, K.E.
Die Typen 1 und 2 des Herpes simplex Virus bei verschiedenen Krankheitsbildern.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2313 - 2314 (1967)

Schneweis, K.E.; Nahmias, A.J.
Antigens of Herpes simplex virus type1 and 2 - immunodiffusion and inhibition passive hemagglutination studies.
Z. Immun.-Forsch. 141, 471 - 487 (1971)

Schneweis, K.E.
Besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Herpes genitalis und Collum-Carcinom?
Gynäkologe 7, 190 - 194 (1974)

Schulte-Holthausen, H. Schneweis, K.E.
Differentiation of Herpes simplex virus serotypes 1 and 2 by DNA-DNA-hybridization.
Med. Microbiol. Immunol. 161, 279 - 285 (1975)

Sim, C.; Watson, D.H.
The role of type specific and cross reacting structural antigens in the neutralization of Herpes simplex virus types 1 and 2.
J. gen. Virol. 19, 217 - 233 (1973)

Sprecher-Goldberger, S.; Thiry, L.; Cattor, J.P.; Hooghe, R.; Pestian, J.
Herpesvirus type 2 infection and carcinoma of the cervix.
Lancet 2, 266 (1970)

Sprecher-Goldberger, S.;
Thiry, L.;
Gould, I.;
Fassin, Y.;
Gompel,C.

Increasing antibody titers to Herpes simplex virus type 2 during follow-up of woman with cervical dysplasia.
Amer. J. Epidem. 97, 103 - 110 (1973)

## Nachwort

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn ausgeführt.

Herrn Professor Dr. K.E. Schneweis, auf den die Anregung zu dieser Arbeit zurückgeht, sage ich meinen herzlichen Dank für die ständige Bereitschaft zu wertvollen Ratschlägen zur Ausführung der Experimente und zur Auswertung der Versuchsergebnisse.

# Lebenslauf

Ich wurde am 14.02.1951 als Sohn des Studiendirektors Heinrich Lehmköster und seiner Ehefrau Renate, geb. Hart, als viertes von fünf Kindern in Siegen/Westf. geboren.

1956 zog meine Familie aus beruflichen Gründen meines Vaters nach Bocholt um. Hier erfolgte 1957 die Einschulung, 1961 wechselte ich auf das altsprachliche St.-Georg -Gymnasium, an dem ich 1969 das Abitur ablegte.

Im Oktober 1969 nahm ich an der Bayrischen-Julius-Maximilians-Universität in Würzburg mein Medizinstudium auf. 1970 legte ich dort das Vorphysikum ab, im April 1972 das Physikum.

Zum Sommersemester 1972 wechselte ich an die Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, an der ich den klinischen Teil meines Studiums absolvierte. Am 26.6.1975 bestand ich in Bonn das medizinische Staatsexamen. Vom 1.9.1975 bis 29.2.1976 war ich als Medizinalassistent auf der Inneren Abteilung der St. Lukas-Klinik, Solingen-Ohligs, tätig. Seit dem 1.3.76 leiste ich meine chirurgische Medizinalassistentenzeit am St. Agnes-Hospital, Bocholt, ab.